

Jerzy Soja, Iwona Gross-Sondej, Krzysztof Śladek

Oddział Inwazyjnej Diagnostyki i Leczenia Chorób Klatki Piersiowej

II Katedra Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UJ

Kierownik Oddziału: prof. dr hab. K. Śladek

Kierownik Katedry: prof. dr hab. A. Szczeklik

PŁUKANIE OSKRZELOWO-PĘCHERZYKOWE W ASTMIE OSKRZELOWEJ

BRONCHOALVEOLAR LAVAGE IN BRONCHIAL ASTHMA

Key words: bronchial asthma, BAL

PNEUMONOL. ALERGOL. POL., 2003, 71, 9-10, 458-463

Wstęp Płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (bronchoalveolar lavage – BAL) zostało po raz pierwszy wykonane na początku ubiegłego wieku przy użyciu sztywnego bronchoskopu w celu usunięcia nadmiaru wydzieliny zalegającej w drogach oddechowych (1). Przełomowym momentem w diagnostyce chorób układu oddechowego było wynalezienie w 1967 r. giętkiego bronchofiberoskopu pozwalającego uwidocznić drogi oddechowe aż do poziomu oskrzeli subsegmentarnych z jednoczesną możliwością pobierania wycinków błony śluzowej oraz wydzieliny oskrzeli do badań. Wartym podkreślenia jest fakt, że badania z wykorzystaniem bronchofiberoskopii i BAL w znacznym stopniu pogłębiły naszą wiedzę na temat patogenazy astmy, przyczyniając się do ustalenia „zapalnej teorii astmy” (2-4).

Wskazania do wykonania BAL Bronchofiberoskopia i BAL nie są badaniami rutynowo wykonywanymi w diagnostyce i leczeniu astmy oskrzelowej. Mają one przede wszystkim znaczenie badawcze umożliwiając analizę podstaw patogenetycznych astmy, w tym także śledzenie mechanizmów wczesnej i późnej fazy reakcji alergicznej po wziewnej lub dooskrzelowej prowokacji swoistym alergenem bądź aspi-ryną (2,3,5). Ponadto metody te dostarczają materiału do badań genetycznych (6,7), a w ostatnich latach dzięki BAL i biopsji błony śluzowej oskrzeli uzyskano wiele nowych informacji na temat przebudowy ściany oskrzeli, tzw. remodelingu w przewlekłej astmie.

Mimo że BAL pozwala na lepsze monitorowanie nasilenia zmian zapalnych w drzewie oskrzelowym niż badania czynnościowe płuc, ze względu na inwazyjność badania jego kliniczne zastosowanie jest ograniczone. Badanie to umożliwia również pomiar w popłuczynach z drzewa oskrzelowego stężeń niektórych leków, takich jak teofilina czy metylprednizolon, jakkolwiek badania te nie są wykonywane rutynowo.

Technika wykonania BAL i problemy w interpretacji wyników

Technika wykonania badania u chorych na astmę oskrzelową nie odbiega od klasycznego BAL. Sól fizjologiczna podawana jest w porcjach po 20-60 ml (zwykle 50 ml), następnie delikatnie odsysana i zbierana do naczynia silikonowego. Objętość odzyskiwanego płynu u chorych na astmę jest mniejsza niż u pozostałych pacjentów i wynosi zwykle od 30 do 40% niezależnie od objętości podawanych porcji. Całkowita ilość podawanego płynu waha się od 150 do 300 ml, zwykle 200 ml. Przekraczanie 250 ml soli zwiększa ryzyko wystąpienia objawów ubocznych przy tej samej skuteczności metody (8). Niekiedy pierwsza odessana porcja analizowana jest odrębnie. Określa się ją mianem frakcji oskrzelowej, podczas gdy pozostałe uznawane są za frakcję pęcherzykową (9). Traktując astmę jako chorobę oskrzeli, przeprowadzono wiele badań oceniających jedynie frakcję oskrzelową, wykorzystując w tym celu dwa balony izolujące fragment plukanego oskrzela, co miało zapewnić większy odzysk oraz wyższe stężenia mediatorów (10). Technika ta stwarzała jednak wiele problemów. Po pierwsze badanie można było wykonać tylko w dużych oskrzelach, po drugie – zamknięcie światła oskrzela znacznie bardziej upośledzało wentylację niż klasyczny BAL. Ponieważ stwierdzono, że drobne oskrzela odgrywają równie ważną rolę w patofizjologii astmy, wydaje się, że rozgraniczenie obu frakcji jest niecelowe.

Metodologia wykonania BAL powoduje pewne ograniczenia. Przede wszystkim wynikają one z trudności w określaniu stopnia rozcieńczenia odzyskanego płynu. W ciągu ostatnich lat podejmowano szereg prób rozwiązania tego problemu. Jako markerów rozcieńczenia używano stężenia albumin lub mocznika, jednakże metody te okazały się nieprecyzyjne z uwagi na dużą zmienność wyników (11). Obecnie otrzymywane wyniki wyrażane są najczęściej jako ilość danej substancji w 1 ml BAL, a skład komórkowy podawany jest w formie odsetkowej (3).

Bezpieczeństwo metody u chorych na astmę oskrzelową

Do początku lat osiemdziesiątych astmę i inne choroby przebiegające z nadreaktywnością oskrzeli uznawano za jedno z głównych przeciwwskazań do bronchoskopii, a tym bardziej BAL. Jednak obecnie przeprowadzono badania które wykazały, że bronchoskopia i BAL mogą być bezpiecznie wykonywane u chorych na astmę (12).

W trakcie BAL dochodzi do spadku saturacji krwi zarówno u astmatyków jak i osób zdrowych. W większości badań, z wyjątkiem pojedynczych doniesień, nie wykazano związku między ciężkością astmy a spadkiem saturacji krwi tętniczej w trakcie zabiegu. Po jego zakończeniu obserwuje się szybki powrót saturacji do wartości wyjściowych, a konieczność przerwania badania zachodzi rzadko, nawet u chorych z niskimi wartościami FEV_1 , poniżej 37% (13).

Kaszel i zmiany osłuchowe nad polami płucnymi w postaci świstów występują często po badaniu, jednakże szybko ustępują po zastosowaniu betamimetyków (13). Objawy grypopodobne i zmiany mięaszowe w obrazie radiologicznym płuc pojawiają się rzadko i mają tendencję do samoistnego ustępowania. BAL może prowadzić do niewielkiego spadku FEV_1 i FVC (13).

Tylko w jednym badaniu obserwowano nasilenie nieswoistej nadreaktywności oskrzeli po BAL i była ona tym większa im cięższy był przebieg astmy. Pozostałe badania nie potwierdziły wpływu BAL na spadek PC_{15} lub PC_{20} ani u osób zdrowych ani u chorych na astmę (14).

Warto zaznaczyć, że jakkolwiek leki rozszerzające oskrzela są powszechnie stosowane w premedykacji u chorych na astmę, niekiedy można odstąpić od ich stosowania, zwłaszcza że mogą one wpływać na uzyskane wyniki badań. Betamimetyki modyfikują bowiem aktywność eozynofików, zmniejszają wydzielanie histaminy i czynników chemotaktycznych z mastocytów, a stosowane przed próbami prowokacyjnymi hamują wczesną fazę reakcji alergicznej (15). Aktualne wytyczne dopuszczają znaczną dowolność w doborze premedykacji, a stosowanie leków rozszerzających oskrzela uzależniają od przyjętego protokołu badania.

BAL – skład komórkowy

Mastocyty i bazofile

Mastocyty zlokalizowane są głównie w błonie śluzowej oskrzeli, mięszu płuca i nabłonku oskrzeli (ok. 20% kom.), natomiast w BAL u osób zdrowych liczba mastocytów jest niewielka: od 0,02 do 0,25% wszystkich komórek, a do ich identyfikacji potrzebne są specjalne techniki barwienia. U chorych na astmę odsetek ten jest kilkakrotnie wyższy. Mastocyty wyizolowane z BAL wykazują po prowokacji alergenem cechy degranulacji, a stężenie histaminy koreluje ze stopniem nieswoistej nadreaktywności oskrzeli, spadkiem FEV_1 oraz nasileniem objawów choroby.

W reakcji alergicznej uczestniczą syntetyzowane przez mastocyty liczne mediatory, między innymi: histamina, tryptaza, leukotrien C₄, prostaglandyna D₂, tromboksan A₂ oraz cytokiny takie jak: interleukiny 4, 5, 6 i $TNF\alpha$ (16).

Eozynofile

Zwiększoną liczbę eozynofików w BAL stwierdza się u chorych na astmę atopową i nieatopową. Ich liczba koreluje z objawami klinicznymi, nasileniem nieswoistej nadreaktywności oskrzeli oraz spadkiem FEV_1 (2). Wziewna lub dooskrzelowa prowokacja alergenem prowadzi do dalszego wzrostu odsetka eozynofili zarówno we wczesnej (do 4 godzin), jak i w późnej fazie reakcji alergicznej (po 96 godzinach) (17). Ich aktywacja przejawia się wzmożoną ekspresją wewnątrzkomórkowych cząstek adhezyjnych typu 1 (ICAM-1), zwiększoną produkcją białek kationowych, PAF, LTC₄, IL-5, $TNF\alpha$, GM-CSF oraz aktywnych rodników tlenowych (18).

Limfocyty

Liczba limfocytów T (CD4+ i CD8+) w BAL jest podwyższona i ulega dalszemu zwiększeniu po prowokacji alergenem. We wczesnej fazie reakcji alergicznej obniżeniu ulega stosunek CD4+/CD8+ z uwagi na dominację limfocytów CD8+, natomiast w późnej przeważają limfocyty CD4+ (17). Wyrazem aktywacji limfocytów Th2 jest wzmożona produkcja IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, GM-CSF oraz rozpuszczalnego receptora dla IL-2 (sIL-2R) (6).

Makrofagi

Makrofagi stanowią najliczniejszą grupę komórek stwierdzanych w BAL. Ich odsetek spada po prowokacji alergenem, prawdopodobnie ze względu na napływ innych komórek do światła oskrzeli. Po stymulacji alergenem makrofagi produkują czynnik chemotaktyczny dla eozynofili (eotaksynę), PGE_2 , PGD_2 , β -glukuronidazę, GM-CSF, cytokiny (IL-1,6,8,10,12 i 13) oraz $TNF\alpha$ i $IFN\gamma$ (6).

Neutrofile

Ich rola w patogenezie astmy nie jest do końca jasna. Zwiększoną liczbę neutrofili stwierdzamy zwykle w późnej fazie reakcji alergicznej, szczególnie w astmie ciężkiej (17). Koreluje ona ze wzrostem stężenia IL-8, co może tłumaczyć ich udział w zapaleniu alergicznym (19).

Komórki nabłonka oskrzeli

Plukanie oskrzelowo-pęcherzykowe zwróciło uwagę na znaczenie komórek nabłonka w astmie oskrzelowej. Zwiększona liczba tych komórek koreluje z nasileniem nieswoistej nadreaktywności oskrzeli u chorych na astmę (2), co prawdopodobnie związane jest ze wzmożonym wydzielaniem endoteliny 1 (ET1) powodującej skurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli (20). O ich udziale w zapaleniu alergicznym świadczy także wzrost produkcji białka chemotaktycznego monocytów (MCP-4) i eotaksyny (21,22).

Badania molekularne a BAL w astmie

Badania genetyczne z wykorzystaniem BAL wykonywane są rzadko albowiem pozyskany tą drogą materiał jest stosunkowo ubogokomórkowy i w dużym stopniu zanieczyszczony, co utrudnia hodowlę, a wyizolowane komórki charakteryzują się małą żywotnością. Rozwój technik biologii molekularnej stworzył nowe możliwości badań nad aktywacją komórek obecnych w BAL. Istnieją doniesienia o wykorzystaniu metody polimerazowej reakcji łańcuchowej w połączeniu z odwrotną transkryptazą (RT-PCR) do określenia ekspresji genów V-beta kodujących receptor limfocytów T (7). RT-PCR posłużyła także do badań ekspresji mRNA cytokin produkowanych przez limfocyty T i makrofagi (6) oraz aktywności genów kodujących receptor $Fc\epsilon RI$ leukocytów obojętnochłonnych (19).

Przebudowa ściany oskrzeli w astmie

Materiał uzyskany drogą BAL posłużył także do badań nad przebudową ściany dróg oddechowych w astmie. Wykorzystując technikę dooskrzelowej segmentarnej prowokacji alergenem stwierdzono znamienne wyższe stężenie czynnika wzrostu fibroblastów (bF-GF) w BAL, będącego silnym mitogenem nie tylko dla tych komórek, ale także dla mięśni gładkich i komórek nabłonka (23). Dzięki tej metodzie wykryto także podwyższone stężenie metaloproteinazy 9 (MMP-9), uszkadzającej nabłonek oddechowy i przyczyniającej się do rozwoju remodelingu (24).

BAL i biopsja błony śluzowej oskrzeli w astmie

Plukanie oskrzelowo-pęcherzykowe nazywane niekiedy „płynną biopsją płuca”, jest obecnie cennym uzupełnieniem badań bioptycznych. Skład komórek za-

palnych w BAL i w wycinkach błony śluzowej oskrzeli wyraźnie się różni (25). W BAL u osób zdrowych dominują makrofagi, stanowiące od 80 do 90% wszystkich komórek, następnie stwierdzamy limfocyty (10-20%), eozynofile poniżej 4% i mastocyty (zaledwie 0,25%). W błonie śluzowej oskrzeli przeważają natomiast limfocyty, stanowiące od 60 do 90% komórek w obrębie nabłonka i 40-80% komórek w błonie podśluzowej. Odsetek mastocytów jest wysoki, sięga nawet 20%, podczas gdy liczba makrofagów nie przekracza 10%. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że dopiero wykorzystanie obu metod pozwala na uzyskanie pełnego obrazu procesów zapalnych toczących się w drogach oddechowych.

Alternatywne metody diagnostyczne:

1. Badanie płwociny indukowanej

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się indukcji płwociny. Użytkany tą drogą materiał jest bardziej skondensowany, cechuje się większą liczbą uzyskiwanych komórek oraz wyższymi stężeniami mediatorów reakcji alergicznej, takich jak ECP i tryptaza (26). Coraz liczniejsze publikacje podkreślają znaczenie indukowanej płwociny w badaniach patomechanizmów astmy, monitorowaniu jej przebiegu oraz odpowiedzi na stosowane leczenie przeciwzapalne. Metoda ta wykorzystywana jest także w diagnostyce różnicowej chorób przebiegających z przewlekłym kaszlem, w tym eozynofilowego zapalenia oskrzeli. Mimo znacznej czasochłonności zapewnia większą porównywalność wyników niż BAL, dzięki łatwiejszej standaryzacji rozcieńczeń.

2. Badanie mediatorów zapalenia w powietrzu wydechowym

Jest metodą nieinwazyjną, prostą, pozwalającą na pomiar stężeń mediatorów zapalenia w powietrzu wydechowym, głównie tlenku azotu (NO). Stanowi kolejną metodę stopniowo ograniczającą kliniczne zastosowanie BAL w astmie oskrzelowej. W miarę rozwoju techniki możliwym staje się oznaczanie w powietrzu wydechowym innych mediatorów zapalenia, takich jak: tlenek węgla (CO) (27), leukotrieny i prostaglandyny (28), IL-4, IFN- γ (29) oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2) (30). Analiza składu gazów wydechowych jest szczególnie użyteczna w diagnostyce chorób dróg oddechowych u dzieci, u których badanie BAL oraz indukcja płwociny są trudne lub wręcz niemożliwe do wykonania.

Piśmiennictwo:

1. Zollner F.; Gustav Killian, father of bronchoscopy. Arch. Otolaryngol. 1985; 82: 656-9.
2. Wardlaw A.J. i wsp. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. Am. Rev. Respir. Dis. 1988; 137: 62-9.
3. Smith D.L., Deshazo R.D. Bronchoalveolar lavage in asthma. An update and perspective. Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148: 523-32.
4. International consensus report on diagnosis and management of asthma. Allergy 1992; 47: 128-32.
5. Jahnz-Rożyk K. i wsp. Expression of adhesion molecules LFA-1 (CD11a) and ICAM-1 (CD54) on lymphocytes and chemokines, IL-8 and MCP-1 concentrations in bronchoalveolar lavage of patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease. Pol. Merkuriusz. Lek. 2000; 9 (52): 649-52.
6. Bodey K.J. i wsp. Cytokine profiles of BAL T cell clones obtained from human asthmatic airways after local allergen challenge. Allergy 1999; 54 (10): 1083-93.
7. Wahlstrom J. i wsp. T cell receptor V-beta expression in patients with allergic asthma

- before and after repeated low-dose allergen inhalation. *Clin. Immunol.* 2001; 100 (1): 31-9
8. Pirożyński M. i wsp. Bronchoalveolar lavage: comparison of three commonly used procedures. *Respiration* 1991; 58: 72-6.
9. Rennard SI. i wsp. Fractional processing of sequential bronchoalveolar lavage to separate bronchial and alveolar samples. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141: 208-17.
10. Eschenbacher WL., Gravelyn TR. A technique for isolated airway segmental lavage. *Chest* 1987; 92: 105-9.
11. Ward C. i wsp. The origin of water and urea sampled at bronchoalveolar lavage in asthmatic and control subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146: 444-7.
12. National Heart, Lung and Blood Institute Workshop Summary. Summary and recommendations of the workshop on the investigative use of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in individuals with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1985; 76: 145-7.
13. van Vyve T. i wsp. Safety of bronchoalveolar lavage and bronchial biopsy in patients with asthma of variable severity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 146: 116-121.
14. Gianiorio P. i wsp. Bronchial responsiveness is not increased by bronchoalveolar and bronchial lavage performed after allergen challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 143: 105-8.
15. Howarth PH. i wsp. Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipratropium on the airway and circulating mediator responses to allergen bronchial provocation in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1985; 132: 986-92.
16. Liu MC. i wsp. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of peripheral airways in allergic asthmatics: cellular, mediator and permeability changes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 51-8.
17. Metzger WJ. i wsp. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatics lungs: description of the model and local airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135: 433-40.
18. Sedgwick JB., Calhoun WJ., Busse WW. Functional comparison of human airway and peripheral blood eosinophils: effect of interleukin-5 (IL-5). *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992; 89:310.
19. Gounni AS. i wsp. Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. *FASEB J.* 2001; 15(6): 940-9.
20. Trakada G. i wsp. Arterial and bronchoalveolar lavage fluid endothelin-1 concentration in asthma. *Respir. Med.* 2000; 94(10): 992-6.
21. Lilly CM. i wsp. Eotaxin expression after segmental allergen challenge in subjects with atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163(7): 1669-75.
22. Lamkhioused B. i wsp. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 162(2 Pt 1): 723-32.
23. Redington AE. i wsp. Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001; 107(2): 384-7.
24. Kelly EA., Busse WW., Jarjour NN. Increased matrix metalloproteinase-9 in airway after allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 62 (3 Pt 1): 1157-61.
25. Jeffery PK., Wardlaw AJ., Nelson. i wsp.: Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1989; 140: 1743-53.
26. Pizzichni E. i wsp. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subset and soluble markers compared. *Eur. Respir. J.* 1998; 11 (4): 828-34.
27. Zanconato S. i wsp. Exhaled monoxide levels after a course of oral prednisone in children with asthma exacerbation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109 (3): 440-5.
28. Montuschi P., Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109 (4): 615-20.
29. Shahid SK. i wsp. Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165 (9): 1290-3.
30. Magnussen H., Holtz O., Sterk PJ., Hargreave FE. Noninvasive methods to measure airway inflammation: future considerations. *Eur. Respir. J.* 2000; 16: 1175-1176.

Wpłynęła: 18.02.2003 r.

Adres: II Katedra Chorób Wewnętrznych CM UJ 31-066 Kraków ul. Skawińska 8,
tel. (12) 430 51 47 fax (12) 430 51 15